

AC

Excerpt Translation of Japanese Patent Kokai No. 246,097/95

(1) Translation of page 2, 1st column, lines 1 to 24

"Claims:

1. A process for producing trehalose, c h a r a c t e r i z e d in that it comprises the steps of culturing a trehalose-producible yeast of the genus *Candida*, and collecting the produced trehalose from the resulting culture.

2. The process of claim 1, wherein said yeast is a trehalose-assimilation defective yeast strain.

3. The process of claim 1, wherein said yeast is a trehalose-assimilation revertant obtained from a trehalose-assimilation and trehalose-accumulation defective yeast strain.

4. The process of claim 1, wherein said yeast is a microorganism of the genus *Candida fermentii* No. 3110tn strain, FERM P-14187.

5. The process of claim 1, wherein said yeast is a microorganism of the genus *Candida fermentii* No. 3110tr strain, FERM P-14188."

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-246097

(43) 公開日 平成7年(1995)9月26日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12P 19/12		7432-4B		
//(C12P 19/12				
C12R 1:72 )				

審査請求 有 請求項の数 5 F D (全7頁)

(21) 出願番号	特願平6-62205	(71) 出願人	390038829 通商産業省基礎産業局長 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
(22) 出願日	平成6年(1994)3月8日	(72) 発明者	仲田 邦穂 神奈川県藤沢市立石1-8-10
		(72) 発明者	岡村 和彦 神奈川県藤沢市藤沢2502-1
		(72) 発明者	刀根 弘 神奈川県横浜市金沢区並木3-7-4-10 03

(54) 【発明の名称】 トレハロースの製造方法

(57) 【要約】

【目的】 医薬品、食品、農業分野への応用が期待されるトレハロースの新規な製造方法を提供する。

【構成】 キャンディダ (Candida) 属に属するトレハロース生産性酵母、例えば、トレハロース資化性を欠損させた突然変異株であるキャンディダ フェアメンティ (Candida fermentii) No. 3110tn株 (FERM P-14187)、トレハロースの資化性と蓄積性を同時に欠損した菌株から得たトレハロース資化性復帰変異株であるキャンディダ フェアメンティ (Candida fermentii) No. 3110tr株 (FERMP-14188) などを培養し、培養物からトレハロースを採取することによりトレハロースを効率的に製造する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 キャンディダ (*Candida*) 属に属するトレハロース生産性酵母を培養し、培養物からトレハロースを採取することを特徴とするトレハロースの製造方法。

【請求項2】 キャンディダ (*Candida*) 属に属するトレハロース生産性酵母がトレハロース資化性を欠損させた菌株である請求項1記載のトレハロースの製造方法

【請求項3】 キャンディダ (*Candida*) 属に属するトレハロース生産性酵母がトレハロースの資化性と蓄積性を同時に欠損した菌株から得たトレハロース資化性復帰変異株である請求項1記載のトレハロースの製造方法

【請求項4】 キャンディダ (*Candida*) 属に属するトレハロース生産性酵母がキャンディダ フェアメンティ (*Candida fermentii*) No. 3110tn株 (FERM P-14187) である請求項1記載のトレハロースの製造方法

【請求項5】 キャンディダ (*Candida*) 属に属するトレハロース生産性酵母がキャンディダ フェアメンティ (*Candida fermentii*) No. 3110tr株 (FERM P-14188) である請求項1記載のトレハロースの製造方法

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、医薬品、食品、農業分野への応用が期待されるトレハロースの新規な製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 トレハロースは、生物に普遍的に存在し、微生物や植物においてはエネルギー貯蔵物質として、また熱、乾燥、凍結、浸透圧などの環境変化に対する保護物質として知られている。酵母においても、例えばパン酵母におけるトレハロースの蓄積と環境耐性との関係が明らかにされている (化学と生物 31, 6, 374~381, 1993)。また昆虫においては、飛行のエネルギー源として利用されることが知られている。

【0003】 一方、トレハロースの製造方法として、

1) パン酵母などのトレハロース蓄積量の多い菌株を培養し、熱水やアルコールなどで抽出する方法 (特開平4-360692号、特開平5-91890号)、2) プレバクテリウム属などの細菌を用いて培養液中に生産させる方法 (特開平5-212882号)、3) マルトースをマルトースホスホリラーゼとトレハロースホスホリラーゼ処理することによる方法 (特開昭58-216695号) などが知られている。

【0004】 また、パン酵母などでは、トレハロースの蓄積量を増加させるために細胞内のトレハロース分解酵素 (トレハラーゼ) の活性を抑える試み (例えば、変異

によるトレハラーゼ活性の欠損、酵素阻害剤の添加など) がなされてきたが、細胞内には性質の異なる種々のトレハラーゼが各所に存在し、また様々な原因でそれらは誘導されるので、その活性を抑えることは困難であるとされている。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、トレハロースを効率的に製造する方法を提供するものである。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、キャンディダ (*Candida*) 属、特にキャンディダ フェアメンティ (*Candida fermentii*) に属する酵母が細胞内にトレハロースを構成的に蓄積すること、その酵母のトレハラーゼ活性が変異処理により容易に欠損できること、さらにこれらの突然変異株が変異する前の酵母に比べ著量のトレハロースを生産することを見出し、本発明を完成した。

【0007】 すなわち、本発明は、キャンディダ (*Candida*) 属に属するトレハロース生産性酵母の突然変異株を培養し、培養物からトレハロースを採取することを特徴とするトレハロースの製造方法を提供するものである。

【0008】 本発明に使用する酵母は、キャンディダ (*Candida*) 属に属し、トレハロースを生産する能力を有する菌株を変異処理によりトレハロース資化性を欠損させた菌株であるか、あるいは同じくキャンディダ (*Candida*) 属に属し、トレハロースを生産する能力を有する菌株を変異処理によりトレハロースの資化性と蓄積性を同時に欠損した菌株から得たトレハロース資化性復帰変異株であれば、いずれの菌株でも使用できる。

【0009】 本発明に使用する酵母の親菌株は、例えば中華民国台中市で採取された土壌から分離されたキャンディダ フェアメンティ (*Candida fermentii*) No. 3110株 (FERM P-12348) を挙げることができるが、この菌株以外でもキャンディダ (*Candida*) 属に属し、トレハロースを生産する能力を有する菌株であれば、いずれも本発明に用いられる変異菌株の親菌株として用いることができる。また、本発明の目的に適する変異菌株を単離するには、トレハロースを生産する能力を有する前述の親菌株をそれぞれ公知の変異方法、例えば、紫外線処理、NTG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン) 処理などを行い、適宜選択すればよい。

【0010】 なお、キャンディダ フェアメンティ (*Candida fermentii*) No. 3110株は、以下の菌学的性状を有する。

## 1. 形態的性質

3~7  $\mu$ mの卵型ないしは球形をし、菌糸様の構造体はない。セッコウ、クライン培地、麦芽エキス培地のいず

れでも胞子は全く形成しない。

【0011】2. 生理学的性質

バーネット (J. A. Barnett) らによるイースト (Yeast) : キャラクタリゼーション アンド アイデンティフィケーション (characteriza-

tion and identification) 第2版に従い、分類同定を行った。本菌株の各種生理学的性質は、以下の通りである。

【0012】

(1) 発酵性試験

D-グルコース	+	ラクトース	-
D-ガラクトース	-	セロビオース	-
マルトース	-	メレチトース	-
メチル $\alpha$ -D-グルコサイド	-	ラフィノース	+
シュークロース	+	イヌリン	+
$\alpha$ , $\alpha$ -トレハロース	-	スターチ	-
メリビオース	-	D-キシロース	-

【0013】

(2) 生育試験

D-グルコース	+	D-ガラクトース	-
L-ソルボース	+	D-グルコサミン	-
D-リボース	-	D-キシロース	-
L-アラビノース	-	L-ラムノース	-
シュークロース	+	マルトース	-
$\alpha$ , $\alpha$ -トレハロース	+	メチル $\alpha$ -D-グルコサイド	-
セロビオース	-	サリシン	-
アルブチン	-	メリビオース	-
ラクトース	-	ラフィノース	+
メレチトース	-	イヌリン	+
スターチ	-	グリセロール	+
エリスリトール	-	リビトール	-
キシリトール	+	L-アラビトニール	-
D-グルシトール	-	D-マンニトール	+
ガラクトール	-	ミオイノシトール	-
D-グルコノ-1, 5-ラクトン	+	2-ケト-D-グルコン酸	+
5-ケト-D-グルコン酸	-	D-グルコン酸	-
D-グルクロン酸	+	D-ガラクトツロン酸	-
DL-乳酸	+	コハク酸	-
クエン酸	-	メタノール	-
エタノール	-	プロパン-1, 2-ジオール	-
ブタン-1, 2-ジオール	-	硝酸カリウム	-
亜硝酸カリウム	-	エチルアミン	-
L-リジン	+	ガダベリン	D
クレアチニン	-	グルコサミン	+
ビタミン 欠	+	D: 生育が遅れる	

【0014】(3) 耐性試験

0.01% シクロヘキシミド	-
0.1% シクロヘキシミド	-
1% 酢酸	-
50% D-グルコース	+
60% D-グルコース	+

【0015】(4) 生育温度

25℃	+
30℃	+

35℃	-
37℃	-
40℃	-

(5) 追加試験

DBB反応 -

【0016】3. その他の性質

(1) ユビキノ側鎖数

アグリカルチュラル アンド バイオロジカルケミスト  
50 リー (Agricultural Biologica

1 Chemistry) 第37巻、第3号、621頁(1973年)に従い、逆相薄層クロマトグラフィーを用いて測定したところ、ユビキノ側鎖数は6単位であった。

#### 【0017】(2) GC含量

学会出版センター刊、駒形和男編、微生物の化学分類実験法、227頁-242頁の方法で行い、島津分光光度計UV-2110と温度コントローラーSRP-8を用いて、60-100℃の40分間の直線温度勾配の際の、1×SSC緩衝液中の染色体DNAのA260変化を追跡し、測定したTm値からGC(%)=(Tm-69.3)/0.41の式のより求めたところ、本菌株の核DNAのGC含量(モル%)は、44.9%であった。

【0018】本発明の方法に使用するトレハロース資化性を欠損しトレハロースを生産する菌株としては、上記のキャンディダ(Candida)属に属する酵母に由来するもので、トレハロース資化性を欠損する変異により得られる、トレハロース資化性がなくトレハロースを生産する菌株がすべて含まれるが、好適なものとして、前記キャンディダ フェアメンティ(Candida fermentii) No. 3110株を紫外線による変異処理により得られたキャンディダ フェアメンティ(Candida fermentii) No. 3110tn株を挙げることができる。

【0019】本発明の目的に適する、トレハロース資化性を欠損しトレハロースを生産する菌株を単離するには、キャンディダ(Candida)属に属し、トレハロースを生産する能力を有する菌株をそれ自体公知の変異処理を行うことにより取得することができる。以下、その一例を示す。

【0020】キャンディダ フェアメンティ(Candida fermentii) No. 3110株の1白金耳をMY液体培地(酵母エキス0.3%、麦芽エキス0.3%、ポリペプトン0.5%、グルコース1%、pH5.5)に接種し、28℃で16時間培養し、滅菌水で2回洗浄した。これをシャーレに入れ、30cmの距離から紫外線ランプ(15W)で2分間照射した後、炭素源を欠くイーストニトロゲン培地(Difco) 5mlに懸濁し、一夜培養した。遠心分離により集菌し、トレハロースを0.5%含むイーストニトロゲン培地に懸濁し、5時間培養した後、ナスタチンを10μg/ml添加し、さらに2時間培養を継続した。これを滅菌水で2回洗浄し、グリセリンMYプレート(酵母エキス0.3%、麦芽エキス0.3%、ポリペプトン0.5%、グリセリン1%、寒天2%、pH5.5)にまき、生育したコロニーの中でトレハロースを炭素源とする培地で生育できない菌株を選択した。

【0021】単離した菌株をMY液体培地で上記と同様に培養し、遠心分離により菌体を集め、冷却したアセト

ンで2回洗浄した。吸引によりアセトンを除き、粉末を得た。獲られた粉末の10mgを25mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)180μlに懸濁し、さらに250mMトレハロース水溶液20μlを加え、経時的に残存するトレハロースを液体クロマトグラフィー法により測定したところ、多数のトレハロース分解活性欠損株が得られた。なお、カラムはCLC-NH<sub>2</sub>(島津製作所)、移動相は70%アセトニトリル、検出器は示差屈折計RID-7A(島津製作所)を用いた。

【0022】次にこれらトレハロース分解活性欠損株の細胞内トレハロース量を以下の方法で測定し、親菌株と比較してトレハロース蓄積量が顕著に増加した菌株を選択した。すなわち、上記の操作により得られたトレハロース分解活性欠損株を30mlのMY液体培地(酵母エキス0.3%、麦芽エキス0.3%、ポリペプトン0.5%、グルコース1%、pH5.5)を含む250mlフラスコに接種し、25℃で1~2日間培養し、これを遠心分離で集菌し水でよく洗浄した後、さらに30mlの水の懸濁し、120℃、15分加熱処理し、細胞内のトレハロースを抽出し、液体クロマトグラフィー法によりトレハロースを定量して、親菌株と比較し蓄積量が顕著に増加した菌株を選択した。

【0023】以上の方法により、本発明の目的に適する変異菌株は、グリセリンMYプレートに生育するコロニー100株に約1株の割合で取得された。このようにして得られる菌株の一つであるキャンディダ フェアメンティ(Candida fermentii) No. 3110tn株の菌学的性状は、トレハロース資化性が欠損していることを除き、親菌株であるNo. 3110株と同一の性質を示した。

【0024】本菌株は、平成6年1月 日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所へ、キャンディダ フェアメンティ(Candida fermentii) No. 3110tn(FERM P-14187)として寄託されている。

【0025】さらに本発明の方法に使用するもう一つの変異株であるトレハロースの資化性と蓄積性を同時に欠損した菌株から得たトレハロース資化性復帰変異株としては、上記のキャンディダ(Candida)属に属する酵母に由来するもので、トレハロースの資化性と蓄積性を同時に欠損した菌株からトレハロース資化性が回復した復帰変異により得られる、トレハロースを生産する菌株がすべて含まれるが、好適なものとして、前記キャンディダ フェアメンティ(Candida fermentii) No. 3110株を紫外線により変異させたトレハロースの資化性と蓄積性を同時に欠損した菌株から分離した、トレハロース資化性復帰変異株キャンディダ フェアメンティ(Candida fermentii) No. 3110tr株を挙げることができる。

【0026】本発明の目的に適する、トレハロースの資

化性と蓄積性を同時に欠損した菌株からトレハロース資化性が回復したトレハロースを生産する復帰変異菌株を単離するには、それ自体公知の手法により、カンディダ (*Candida*) 属に属するトレハロース生産菌株を処理して取得することができる。以下、その一例を示す。

【0027】カンディダ フェアメンティ (*Candida fermentii*) No. 3110株を前記したトレハロースの分解活性欠損株を取得する操作と同様の手順で変異処理及び細胞内トレハロース量の測定を行い、トレハロースの資化性と蓄積性を同時に欠損した菌株を取得した。以上の方法により、資化性と蓄積性を同時に欠損した変異菌株は、グリセリンMYプレートに生育するコロニー100株に約1株の割合で取得された。この $10^8 \sim 10^9$ 個をトレハロースを炭素源とするイーストニトロゲン培地 (トレハロース0.5%) に塗布し、28℃、3日間培養することにより、 $10^8$ 程度の頻度でトレハロースを資化できる復帰変異株を得ることができる。

【0028】このようにして得られる菌株の一つであるカンディダ フェアメンティ (*Candida fermentii*) No. 3110 tr 株の菌学的性状は、親菌株であるNo. 3110株と同一の性質を示した。

【0029】本菌株は、平成6年1月 日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所へ、カンディダ フェアメンティ (*Candida fermentii*) No. 3110 tr (FERM P-14188) として寄託されている。

【0030】本発明のよるトレハロースの製造は、カンディダ (*Candida*) 属に属する酵母に由来し、トレハロース資化性を欠損したトレハロースを生産する菌株、例えば、前記カンディダ フェアメンティ (*Candida fermentii*) No. 3110 tn 株、あるいはカンディダ (*Candida*) 属に属する酵母に由来し、トレハロースの資化性と蓄積性を同時に欠損した菌株から得たトレハロース資化性復帰変異株、例えばカンディダ フェアメンティ (*Candida fermentii*) No. 3110 tr 株を栄養源含有培地に接種して、好氣的に増殖させることにより生産される。

【0031】その栄養源としては、酵母の栄養源として通常使用されるもの、例えば炭素源としては、グルコース、グリセリン、シュクロースなどが使用でき、窒素源としては、例えば肉エキス、酵母エキス、ペプトン、コーンステイープリカーなどの有機物、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの無機体窒素が利用できる。また、必要に応じて、食塩、塩化カリウム、リン酸塩、その他重金属塩などの無機塩類およびビタミン類を添加する他、培養

中の発泡を抑制するため、例えばシリコーン (信越化学株式会社製-KM75; 商標) などの消泡剤を適宜添加することができる。

【0032】温度、pH、通気攪拌および培養時間のような培養条件は、用いられる菌株が最大量のトレハロースを蓄積するように選択する。例えば、MY液体培地を用いた場合、20~37℃、好ましくは28~33℃の温度でpH4~7、好ましくは5~6において1~2日間行うのが有利である。

10 【0033】培養物よりトレハロースを単離するには、公知の分離手段を適宜組合せて行うことができる。トレハロースは酵母菌体内に蓄積するので、例えば菌体をメタノール、エタノール、アセトンなど水と混和する有機溶媒に懸濁し、菌体からトレハロースを抽出し遠心分離または濾過により菌体を分離し上清を得、これを減圧濃縮、イオン交換樹脂処理、結晶化などの精製操作を単独あるいは適宜組合せて、さらに場合によっては反復して適用することによりトレハロース結晶を得ることができる。

20 【0034】上記の培養方法で培養した場合には、前記のとおりトレハロースは酵母菌体内に蓄積するが、培養の途中でメタノール、エタノール、アセトンなど水と混和する有機溶媒を2~6%、あるいはデジトニンなどの界面活性剤を0.1~1%培地中に添加するか、または培養した酵母菌体を冷却したメタノール、エタノール、アセトンなど水と混和する有機溶媒で洗浄することにより菌体内で生産されたトレハロースが菌体外に排出する透過型の菌体に行うことができる。これらの処理により菌体の増殖能は失われるが、培地中の栄養物からトレハロースを生産する能力は失われない。

30 【0035】有機溶媒で洗浄することにより調製した透過型の菌体は直ちにトレハロースの生産に使用してもよいが、0~10℃、好ましくは4℃で保存することができる。さらにκ-カラギーナン、アルギン酸カルシウムなどのゲル化担体を用いて固定化菌体とすることにより、その安定性が向上する。このような処理を施した菌体を用いるとトレハロースが培養液中に生産されるので精製の際に菌体からの抽出操作を省略でき有利である。

【0036】

40 【実施例】以下、実施例を示し本発明をさらに詳細に説明する。

【0037】実施例1

酵母エキス0.3%、麦芽エキス0.3%、ポリペプトン0.5%、グルコース1% (pH5.5) からなるMY液体培地100mlを500ml容振とうフラスコに入れ、120℃、20分加熱滅菌した。この培地にカンディダ フェアメンティ (*Candida fermentii*) No. 3110 tn 株を1白金耳接種し、28℃、16時間振とう培養した。得られた培養液を50000×g、5分間遠心分離して集菌し、これに50m

1の水を加えて攪拌し、同様に遠心分離を繰り返し計3回洗浄した。得られた湿菌体1gを60%エタノール25mlに懸濁し、80℃で1時間加熱処理した。室温まで冷却し、5000×g、5分間遠心分離することにより菌体を除去してトレハロース含有抽出液を得た。これを活性炭処理し、凍結乾燥して純度90.5%のトレハロース粉末90.5mgを得た。

#### 【0038】実施例2

500ml容振とうフラスコにMY液体培地100mlを入れ、120℃、20分加熱滅菌した。この培地にキャンディダ フェアメンティ (*Candida fermentii*) No. 3110tr株を1白金耳接種し、28℃、16時間振とう培養した。得られた培養液を5000×g、5分間遠心分離して集菌し、これに50mlの水を加えて攪拌し、同様に遠心分離を繰り返し計3回洗浄した。得られた湿菌体1gを60%エタノール25mlに懸濁し、80℃で1時間加熱処理した。室温まで冷却し、5000×g、5分間遠心分離することにより菌体を除去してトレハロース含有抽出液を得た。これを活性炭処理し、凍結乾燥して純度91.2%のトレハロース粉末89.5mgを得た。

#### 【0039】実施例3

500ml容振とうフラスコにMY液体培地100mlを入れ、120℃、20分加熱滅菌した。この培地にキャンディダ フェアメンティ (*Candida fermentii*) No. 3110tn株を1白金耳接種し、28℃、16時間振とう培養した。得られた培養液を5

表1

菌 株	緩衝液中のトレハロース濃度 (g/l)		
	16時間後	40時間後	64時間後
No. 3110tn	2.43	3.18	4.50
No. 3110tr	2.18	2.75	3.85

#### 【0043】実施例5

κ-カラギーナン1%を含む25mMリン酸カリウム緩衝液 (pH8.0) 5mlを加熱し、溶解させた後、42℃まで冷却した。これに実施例4で得たNo. 3110tn株の乾燥粉末0.1mgを懸濁させ、さらに室温まで冷却し、固化させた。これを約0.5cm角に切り、1%グルコースを含む25mMリン酸カリウム緩衝液 (pH8.0) に浮遊させ、28℃で振とうした。緩

000×g、5分間遠心分離して集菌し、これに新たなMY液体培地100mlを加えて懸濁した。さらに2%となるようアセトンを追加し、28℃、40時間振とう培養したところ、培地中に1.66g/l (液体クロマトグラフィー法) のトレハロースが蓄積した。

#### 【0040】実施例4

500ml容振とうフラスコにMY液体培地100mlを入れ、120℃、20分加熱滅菌した。キャンディダ フェアメンティ (*Candida fermentii*) No. 3110tn株を1白金耳接種し、28℃、16時間振とう培養した。得られた培養液を5000×g、5分間遠心分離して集菌し、これに25mMリン酸カリウム緩衝液 (pH8.0) 50mlを加えて攪拌し、再度前記条件で遠心分離して洗浄菌体1gを得た。さらにこれを冷却したアセトン50mlで2回洗浄し、真空ポンプで吸引し乾燥させた。こうして得られた粉末0.1gを250mlフラスコに入れ、これに1%グルコースを含む25mMリン酸カリウム緩衝液 (pH8.0) 20mlを加えて懸濁し、28℃で振とうさせた。緩衝液中のトレハロース濃度を液体クロマトグラフィーにより測定した。

【0041】同様の方法でキャンディダ フェアメンティ (*Candida fermentii*) No. 3110tr株についても測定した。これらの結果を表1に示す。

#### 【0042】

【表1】

衝液中のトレハロース濃度を液体クロマトグラフィーにより測定した。

【0044】同様の方法でキャンディダ フェアメンティ (*Candida fermentii*) No. 3110tr株についても測定した。これらの結果を表2に示す。

#### 【0045】

【表2】

表 2

菌 株	緩衝液中のトレハロース濃度 (g/l)		
	16 時間後	40 時間後	64 時間後
No. 3110tn	1. 87	2. 92	3. 58
No. 3110tr	1. 75	2. 56	3. 23